

Date: March 20, 2002 Label No. EV074199717US

I hereby certify that, on the date indicated above, I deposited this paper with identified attachments and/or fee with the U.S. Postal Service and that it was addressed for delivery to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 by "Express Mail Post Office to Addressee" service.

Dawn M. Berry
Name (Print)

Dawn M. Berry
Signature

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:)
Kyogo ITOH)
Application No.: 10/062,257)
Filed: February 1, 2002)

Group Art Unit: 1646
Examiner: To Be Assigned

For: TUMOR ANTIGEN

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner of Patents
Washington, DC 20231

March 20, 2002

Sir:

The benefit of the filing date of August 5, 1999 of the following prior Japanese Patent Application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

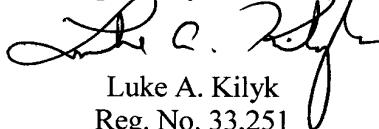
Japanese Patent Application No. JP 1999-222101 filed August 5, 1999

In support of this claim, the requisite certified copy of said original Japanese Patent Application No. JP 1999-222101 is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge such fees to our Deposit Account No. 50-0925.

Respectfully submitted,



Luke A. Kilyk
Reg. No. 33,251

Atty. Docket No.: 3190-014
KILYK & BOWERSOX, P.L.L.C.
53A Lee Street
Warrenton, VA 20186
Tel: (540) 428-1701 -- Fax: (540) 428-1720

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: 1999年 8月 5日

出願番号
Application Number: 平成11年特許願第222101号

[ST.10/C]: [JP1999-222101]

出願人
Applicant(s): 伊東 恭悟

2002年 2月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3009725

【書類名】 特許願
【整理番号】 DP99-1055
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/11
A61K 38/04
【発明の名称】 肿瘍抗原
【発明者】
【住所又は居所】 佐賀県三養基郡基山町けやき台2丁目25番地9号
【氏名】 伊東 恭悟
【特許出願人】
【識別番号】 596094371
【氏名又は名称】 伊東 恭悟
【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】
【氏名又は名称】 庄司 隆
【電話番号】 03-3864-6572
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 067070
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腫瘍抗原

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群より選ばれるポリペプチド；

①配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、

②前記①のポリペプチドのアミノ酸配列を含有するポリペプチド、

③前記①のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド、

および

④前記①から③のポリペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などの変異あるいは誘発変異を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド。

【請求項2】 下記の式で表される配列表の配列番号10に記載のポリペプチド；

T h r - P h e - X a a - X b b - X c c - X d d - X e e - X f f - L e u -
X g g - A s p - X h h - X i i

ここで、Xaaは、AspまたはGlu、

Xbbは、TyrまたはPhe、

Xccは、LeuまたはIle、

Xddは、ArgまたはGln、

Xeeは、SerまたはAla、

Xffは、ValまたはPhe、

Xggは、GluまたはAsp、

Xhhは、PheまたはTyr、

Xiiは、PheまたはTyr、

である。

【請求項3】 配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、または配列番号9に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド。

【請求項4】 請求項2に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド。

【請求項5】 請求項1または3に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項6】 請求項5に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項7】 請求項5または6に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖の塩基配列の少なくとも15個の塩基配列で示され、転写によって発現されるポリペプチドが少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項8】 請求項5から7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項9】 請求項8の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項9の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項11】 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項12】 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドと相互作用して、少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、および／または請求項5から7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項5から7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、または請求項8に記載のベクター、請求項9に記載の形質転換体、請求項11に記載の抗体のうちの少なくとも1

つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項13】 請求項12に記載のスクリーニング方法でスクリーニングされる化合物。

【請求項14】 請求項1または2に記載のポリペプチドの少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞に対する認識性を増強する化合物、または請求項5もしくは6に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物。

【請求項15】 請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む化合物、請求項5から7のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む化合物、請求項8に記載のベクター、請求項9に記載の形質転換体、請求項11に記載の抗体、または請求項13もしくは14に記載の化合物のうちの少なくとも一つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物。

【請求項16】 個体における請求項1から4のいずれか1項に記載のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断手段であって、(a)該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および/または(b)個体由来の試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む診断手段。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規な腫瘍抗原に関し、さらに詳しくは癌特異的細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組換えベクターを含む形質転換体、ポリペプチドの製造方法、ポリペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断のための分析手段に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体における癌の排除には免疫系、特に細胞傷害性T細胞（キラーT細胞）が

重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には癌細胞に対して傷害活性を示す細胞傷害性T細胞の浸潤が認められている（Arch. Surg. 126: 200-205, 1990）。この癌特異的な細胞傷害性T細胞の標的分子（腫瘍抗原）の発見は、メラノーマにおいて初めてなされた。癌細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて8～11個のアミノ酸からなるペプチド（腫瘍抗原ペプチド）になり、HLA分子と結合して癌細胞表面上に提示される。HLAに結合可能な腫瘍抗原ペプチドには、HLAのタイプごとにその配列に規則性（モチーフ）がある。細胞傷害性T細胞は、この腫瘍抗原ペプチドとHLAの複合体を認識して癌細胞を傷害する。

【0003】

近年、細胞傷害性T細胞による認識性を有する腫瘍抗原をコードする多くの遺伝子が、人の癌細胞のcDNAから同定されている（Science, 254: 1643～1647, 1991）（J. Exp. Med., 183: 1185～1192, 1996）。これらは、HER/neu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 432～436, 1995)、変異cdk (Science, 269: 1281～1284, 1995)、そして変異CASP-8 (J. Exp. Med., 186: 785～793, 1997) を含み、細胞性増殖および悪性形質転換体中に含まれる。MAGE (メラノーマ抗原) ファミリー (Cancer Res., 55: 3478～3482, 1995) とSART1 (J. Exp. Med. 187: 277～288, 1998) を含む他のいくつかの遺伝子産物は、悪性細胞と精巣の両方で、選択的に発現しているが、その他の正常細胞では発現していない。

【0004】

多くのメラノーマ特異的な腫瘍抗原は、MART-1/melanA, gp100、およびチロシナーゼを含み、正常メラニン細胞にも共通に存在する (Oncogene Res., 1: 357～374, 1987)。それゆえ、ヒトの腫瘍抗原は、殆どの場合、真に癌特異抗原というのではなく、むしろそれらはいくつかの正常細胞や組織で発現する自己抗原といえる。

【0005】

現在、欧米では、腫瘍抗原ペプチド投与し、癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされており、メラノーマ特異的腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2 (IL-2) を静脈注射投与すると、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている (Nature Medicine, 4:321, 1998)。このように、腫瘍抗原はワクチンとして利用することにより、有効な癌治療効果を期待できる。

【0006】

しかしながら、同定されている腫瘍抗原はそのほとんどがメラノーマ由来であり、発病頻度の高い、上皮性の癌や腺癌由来の腫瘍抗原についての報告は少ない

既存の三大癌治療（手術療法、化学療法、および放射線治療）での1998年における5年生存率は全癌で41%であるが、生存率を増加させることは現状では難しく、上記三大治療法に加え新たな治療法の開発が望まれている。

【0007】

srcファミリー・チロシンキナーゼをコードするlck遺伝子（これはT細胞の発生と機能において本質的であるp56^{lck}）は、大腸癌と小細胞性肺癌細胞において異常に発現している (Oncogene Res., 1:357~374, 1987)。しかしながら、いくつかの明白な事実が腫瘍性形質転換の過程におけるLckタンパクの寄与を示唆している (Cancer Res., 58:4660~4666, 1998) が、これらの癌細胞におけるLckタンパクの詳細な役割は知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、腺癌、および上皮性の癌、例えば大腸癌や肺癌の患者の特異的免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞による認識性を有する新規な腫瘍抗原を見出し、提供することである。

具体的には少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞により認識される、lck遺伝子がコードする抗原エピトープを有するペプチドを見出し、

提供することである。詳しくは、HLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組換えベクターを含む形質転換体、ポリペプチドの製造方法、ポリペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断手段を提供することである。

【0009】

【解決のための手段】

課題解決のため、本発明者は、食道癌患者から確立したHLA-A24と腫瘍抗原ペプチドを認識して活性化されるHLA-A2402拘束性・癌特異的細胞傷害性T細胞（KE4-CTL）を用い、この癌特異的細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、KE腫瘍細胞株のcDNAライブラリーから同定し、さらにHLA-A2402拘束性細胞障害性T細胞により認識される、該腫瘍抗原のエピトープを有するペプチドを見出し、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定することにより、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は、下記の群より選ばれるポリペプチド；①配列表の配列番号1～9に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、②前記①のポリペプチドのアミノ酸配列を含有するポリペプチド、③前記①のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド、および④前記①から③のポリペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加等の変異あるいは誘発変異を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド；配列表の配列番号10に記載の、式T h r - P h e - X a a - X b b - X c c - X d d - X e e - X f f - L e u - X g g - A s p - X h h - X i i で表されるアミノ酸配列、ここで、Xaaは、AspまたはGlu、Xbbは、Tyrまた

はPhe、Xccは、LeuまたはIle、Xddは、ArgまたはGln、Xeeは、SerまたはAla、Xffは、ValまたはPhe、Xggは、GluまたはAsp、Xhhは、PheまたはTyr、Xiiは、PheまたはTyrである、からなるポリペプチド；配列表の配列番号1～10に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド；本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖；本発明のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド；本発明のポリヌクレオチドまたはその相補鎖の塩基配列の少なくとも15個の塩基配列で示され、転写によって発現されるポリペプチドが少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有する、ポリヌクレオチド；本発明のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター；本発明の組換えベクターで形質転換された形質転換体；本発明の形質転換体を培養する工程を含むポリペプチドの製造方法；本発明のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体；本発明のポリペプチドと相互作用して、少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、および／または本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、本発明のポリペプチド、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の形質転換体、本発明の抗体のうちの少なくとも一つを用いることを特徴とするスクリーニング方法；本発明のスクリーニング方法でスクリーニングされる化合物；本発明のポリペプチドの少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞に対する認識性を増強する化合物、または本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物；本発明のポリペプチドを含む化合物、本発明のポリヌクレオチドを含む化合物、本発明のベクター、本発明の形質転換体、本発明の抗体、または本発明の化合物のうちの少なくとも一つを含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物；本発明のポリペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断手段であって、(a)該ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および／または(b)個体由来の試料中の該ポリペプチドをマーカーとして分析することを含む手段を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

(lck遺伝子の同定)

本発明者らは、日本人の多数においてみられるHLA-A分子の型であるHLA-A24に着目し、このHLA-A24と腫瘍抗原ペプチドを認識して活性化されるHLA-A2402拘束性・癌特異的細胞傷害性T細胞（KE4-CTL）を、食道癌患者から確立した（Int. J. Cancer, 81:459-466, 1999）。この細胞傷害性T細胞をエフェクターとして使用し、この細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、KE腫瘍細胞株のcDNAライブラリーから同定した。細胞傷害性T細胞の活性化の判定は、ELISAキットを用いて、該細胞傷害性T細胞から產生されるインターフェロン- γ （IFN- γ ）を測定することにより行った。

【0012】

その結果、一つのクローンが、HLA-A24拘束性KE4-CTLによる認識を与えることを見いだし（図1）、このcDNAクローンの塩基配列が1,750塩基（bp）長であり、かつLckタンパクのアミノ酸配列の大部分を含むポジション31-506に対応するlck遺伝子の塩基配列であるポジション283-2,032と100%相同性を有することを見出した。

【0013】

本発明においては、lck遺伝子が、食道癌患者から得られたHLA-A2402拘束性かつ癌特異的な細胞傷害性T細胞（以下、CTLと呼称することもある）により認識される腫瘍エピトープ（tumor epitope）をコードすることを見出した。

【0014】

(ペプチドと分析)

HLA-A2402分子への結合能をもつLck由来ペプチドを得るために、HLA-A24に結合しうる規則的配列（モチーフ、motif）を有するペプチドについて文献検索し、13種の異なる9merまたは10merのペプチドを、lck遺伝子産物の509アミノ酸配列（Nature, 319:682~

685、1986)に基づいて合成した。但し、一部アミノ酸に変更を加えたものもある。

【0015】

腫瘍抗原性ペプチドの検出は、各ペプチドの細胞傷害性T細胞に対する活性化作用の指標として、細胞傷害性T細胞が產生するIFN- γ を測定することにより行った。

【0016】

これらのペプチドのうち、3つのペプチド(Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2))がCTLにおけるIFN- γ 産生増強活性を有していた(図2A)。Lck486-494(配列番号1)またはLck488-497(配列番号2)の、CTLによるIFN- γ 産生を増強する活性は濃度依存的であり、1nM程度で認められた。一方、Lck208-216(配列番号3)の活性は100nM以上で認められた(図2B)。

【0017】

HLA-A2402をトランスフェクトしたVA13細胞を、これらのペプチドでパルスし、刺激(stimulator)細胞として使用した場合も、同様の結果が得られた。3つの各ペプチドでパルスしたC1R/A2402細胞に対する反応におけるKE4-CTLによるIFN- γ 産生は、抗CD3、抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、抗CD4、抗MHCクラスIIおよび抗CD13モノクローナル抗体では阻害されなかった。従って、KE4-CTLはCD3 $^+$ 、CD8 $^+$ 、CD4 $^-$ の細胞表現型を有する。

【0018】

(Lckタンパク質の検出)

種々の細胞および組織におけるタンパクレベルでのLck(56および59kD)の発現を、抗Lckモノクローナル抗体を用いてウェスタンプロット分析により検討した。

【0019】

Lckタンパクは未刺激の末梢血単核球（PBMC）では認められなかったが、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のフィトヘムアグルチニン（phytohemagglutinin；PHA）で48時間刺激した後の活性化されたPBMC（PHA-blast）の細胞質画分には検出されるようになった。Lckタンパク扁平上皮癌（以下、SCCと略称することもある）または腺腫瘍細胞株を含む試験した全ての悪性腫瘍細胞株、並びに食道癌、肺SCCおよび肺腺癌細胞を含む、多種の臓器からの新鮮腫瘍組織の大多数で検出された。特に、Lckタンパクは大腸癌、肺癌、食道癌の組織で、高率に発現していた。一方、非腫瘍性の結腸組織のいずれでも全く検出されなかった。

【0020】

（ペプチドによる細胞傷害性T細胞の誘導）

本発明の3つのペプチド（Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2））について、大腸癌患者から得たPBMCから、Lckタンパクを発現させた腫瘍細胞株（KE4、SW620およびCOLO201）に対するHLA-A24拘束性のCTLを誘導する活性を試験した。

【0021】

Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）を用いてin vitroで3回刺激したPBMC、特にLck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）で刺激したPBMCは、HLA-A24⁻腫瘍細胞（COLO201）に対する反応より、HLA-A24⁺腫瘍細胞（KE4およびSW620）に対する反応においてより多くのIFN- γ を産生した。

【0022】

一方、健常人から得たPBMCは、抗原提示細胞（APC）として放射線照射したPBMCを用いてパルスした3つのペプチドのいずれを用いて刺激しても、HLA-A24拘束性のCTL活性は示さなかった（実施例4の表3）。健常人から得られたPBMCは、ペプチドをパルスした樹状細胞（Dendritic Cell；DC）をAPCとして用いて刺激した時にHLA-A24拘束性の

CTL活性を示した。

【0023】

ペプチドが誘導したCTL活性は、6時間の⁵¹Cr遊離試験により確認した。これらのLck由来のペプチドで刺激したPBMCは、HLA-A24⁺KE腫瘍細胞およびSW620腫瘍細胞を溶解（lysis）したが、健常人からのHLA-A24⁺PHA活性化T細胞またはHLA-A24⁻COLO201腫瘍細胞はいずれも溶解しなかった。

【0024】

Lck由来のペプチドが大腸癌患者のPBMCにおいてCTLを誘導することができたことから、Lckペプチドは大腸癌および他の腫瘍部位でのCD8⁺T細胞により認識される標的分子の一つであると言える。

【0025】

本発明のLck由来のペプチドは、健常人のPBMCについては、腫瘍細胞に対するHLA-A24拘束性のCTL活性を誘導できなかった。これらの結果から、末梢血中のT細胞は、Lckに対して免疫学的寛容状態にあることが示される。本発明者は、Lckペプチドが、大腸癌患者のPBMC中にCTLを誘導することを見出した。

【0026】

さらに、2つのペプチドLck486-494（配列番号1）（T F D Y L R S V L）およびLck488-497（配列番号2）（D Y L R S V L E D F）がHLA-A24⁺腫瘍細胞株を認識するCTLを誘導することができることから、2つのペプチドの重なる領域である、一定のアミノ酸D Y L R S Vを、抗原のエピトープとして認識し、Lckペプチドのこの部位を含むキナーゼドメインを認識する、ペプチドで誘導されたCTLは、腫瘍拒絶に対する意義を有することが示唆される。

【0027】

このアミノ酸配列配列に相同意をもつペプチドを検索したところ、Lckと同じSrcファミリーに属するチロシンキナーゼ（Ann. Rev. Biochem. 54: 897-930, 1985）に、相同意を有するアミノ酸配列をもつ

ものがあることが判明した。

【0028】

これらS r c ファミリー由来のペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成した、P S r c (配列番号4 : T F E Y L Q A F L) 、 P Y e s (配列番号5 : T F E Y I Q S F L) 、 P F y n (配列番号6 : T F E Y L Q S F L) 、 P L y n (配列番号7 : T F D Y L Q S V L) 、 P H c k (配列番号8 : T F E Y I Q S V L) 、 P B l k (配列番号9 : T F E F L Q S V L) も、L c k 由来のペプチドと同様、あるいはそれ以上のC T L活性化能を示した。

【0029】

これらペプチドのアミノ酸配列の相同性から導き出される、下記の一般式で表されるアミノ酸配列からなるペプチドであって、かつ少なくともH L A - A 2 4 0 2 抑束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドに含まれる。

T h r - P h e - X a a - X b b - X c c - X d d - X e e - X f f - L e u
- X g g - A s p - X h h - X i i

ここで、X a a は、A s p またはG l u ,

X b b は、T y r またはP h e ,

X c c は、L e u またはI l e ,

X d d は、A r g またはG l n ,

X e e は、S e r またはA l a ,

X f f は、V a l またはP h e ,

X g g は、G l u またはA s p ,

X h h は、P h e またはT y r ,

X i i は、P h e またはT y r ,

である。

【0030】

本発明の2つのL c k ペプチドおよびS r c ファミリー由来のペプチドは、大腸癌患者からのP BMCでH L A - A 2 4 抑束性のC T L活性を誘導することができ、L c k タンパクは大腸、肺および食道を含む大多数の癌組織で検出できる

ことが判明した。HLA-A24対立遺伝子（allele）は日本人の人口の約60%（多くは、その95%の遺伝型がA2402である）、コーカサス人の20%、アフリカ人の12%（HLA 1991, Vol. 1: 1065~1220, Oxford: Oxford Scientific Publications, 1992）で見られる。従って、本発明のペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。

【0031】

(ポリペプチド)

本発明で、検出された新規腫瘍抗原のアミノ酸配列は、配列番号1～9に示すポリペプチドである。また、配列番号1～9に示すポリペプチドのアミノ酸配列を含有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドに含まれる。さらに本発明のポリペプチドは、この配列番号1～9に示すポリペプチドと、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%をこえる相同性を有するポリペプチドも含む。この相同性をもつポリペプチドの選択は、少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性の強さを指標にして可能である。また、配列番号1～10に示すポリペプチド、および配列番号1～9に示すポリペプチドと好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%をこえる相同性を有するポリペプチドの、アミノ酸数は、HLA-A2402と結合して抗原提示細胞表面上に提示されうる数であり、かつ細胞傷害性T細胞により認識されるエピトープとしての性質を有する数であればよく、少なくとも約5個以上のアミノ酸、好ましくは約7個以上、さらに好ましくは9個ないし10個である。

【0032】

アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、推定される塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を想定する方法等が可能である。

【0033】

このように特定されたポリペプチドを元にして、少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性の強さを指標とすることにより、1ない

し数個のアミノ酸の欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供される。欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術 (U 1 m e r, L. M., S c i e n c e, 219, 666, 1983) を利用することが出来る。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0034】

(ポリヌクレオチド)

本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、配列番号1～9に記載のポリペプチド、これらのポリペプチドのアミノ酸配列を含有するポリペプチド、これらのポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド、および前記のポリペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加等の変異あるいは誘発変異を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチド、配列番号1～9に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖を意味する。さらに、本発明のポリヌクレオチドには、これらのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含される。ポリヌクレオチド分子としてDNA分子を代表例にとると、「DNA分子にストリンジェントな条件下ハイブリダイズするDNA分子」は、例えば前述のMolecular Cloningに記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下ハイブリタイズする」とは、例えば、6×SSC、0.5%SDSおよび50%ホルムアミドの溶液中で42℃にて加温した後、0.1×SSC、0.5% SDSの溶液中で68℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリダイズのシグナルが観察されることを表す。これらのポリヌクレオチドは、いずれも

本発明の新規腫瘍抗原の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。

【0035】

本発明のポリヌクレオチドは、指定されたポリペプチドの領域に対応する少なくとも約15個以上、好ましくは約21～30個以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドおよびその相補鎖を意味する。この有用なポリヌクレオチドの選択および塩基配列の決定は、例えば公知のタンパク質発現系を利用して、発現ペプチドの確認を行うことにより可能である。

【0036】

(形質転換体)

本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞、レトロウィルス等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなる新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドが提供可能である。本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドは、単純タンパクの状態で細胞傷害性T細胞による認識性が確認されており、遺伝子組換え技術による製造方法も、糖による影響を無視できるため、宿主の選択は生産性のみを考慮し容易にできる。本発明の具体例においては、動物細胞系を利用したが、無論これに限定されるものではない。

【0037】

形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法があるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系が利用できる。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せ利用できる。

【0038】

形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養され

る。培養は、発現產生される新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドの生理活性、特に細胞傷害性T細胞による認識性を指標にしておこなってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチによって、生産される。

【0039】

(化学合成)

本発明の新規腫瘍抗原は、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、ペプチド合成（丸善）1975年、“Peptide Synthesis, Interscience, New York 1996”が例示されるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

【0040】

(新規腫瘍抗原およびその由来物の回収)

新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドの回収は、細胞傷害性T細胞に対する認識性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差にもとづく硫安、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作成し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【0041】

(抗体)

抗体は、本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドの抗原決定基を選別して用いて、作成する。抗原決定基は、少なくとも5個、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、配列番号1～9に示すアミノ酸配列と、完全に相同である必要はないが、少なくともポリペプチドが、細胞傷害性T細胞による認識性を有するものであることが必要である。

【0042】

抗体を产生するためには、本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で、単独または担体に結合し

て、動物に対して体液性応答および／または細胞性応答等の免疫誘導をおこなうことによって行われる。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティクロマトグラフィー法である。

【0043】

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

【0044】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、精製用抗体、試薬、標識マーク等として利用できる。

【0045】

(スクリーニング)

かくして調製された新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、または新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数手段を組合せることによって細胞傷害性T細胞の活性化物質のスクリーニングに有効な手段を提供する。

【0046】

(医薬組成物)

このようにして得られた本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき作製したベクター、該ベクターにより形質転換させた細胞、または本発明のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体、細胞傷害性T細胞に対する認識性を増強する化合物、または本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物を、単独または複数組合せて利

用することによって、これらを含有する医薬組成物を提供する。

【0047】

具体的には、本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドを含有する医薬組成物は、いわゆる癌ワクチンとして使用され、細胞性免疫の賦活のために、適当なアジュバントの存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いる。担体は、自身が人体に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。剤形は、自体公知のポリペプチド製剤の手段を応用して適宜選択できる。その投与量は、細胞傷害性T細胞による認識性により変化するが、一般的には活性本体として0.01mg～100mg／日／成人ヒト、好ましくは0.1mg～10mg／日／成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

【0048】

本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、その相補鎖は、癌の遺伝子治療のために有用である。これらDNAをベクターに担持させ、直接体内に導入する方法またはヒトから細胞を採取したのち体外で導入する方法があるが、いずれも利用できる。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性である。その投与量は、細胞傷害性T細胞による認識性により変化するが、一般的には本発明の腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドをコードするDNA含量として0.1μg～100mg／日／成人ヒト、好ましくは1μg～50mg／日／成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

【0049】

診断手段としては、本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるポリペプチドの発現に関連した疾患（特に消化器系癌）の診断手段として有用であり、例えば当該ポリペプチドをコードしている核酸配列との相互作用・反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、および／または当該ポリペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、および／または当該ポリペプチドの存在、個体由来の試料中の存在量を決定することによって行われる。詳しく

は、新規腫瘍抗原を診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。なお、ここで言う手段とは、目的達成のために使用する方法及び／または媒体を意味する。すなわち、手段には、診断のための方法、診断に用いる試薬キットなどが含まれる。

【0050】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0051】

【実施例1】

(1c k 遺伝子の同定)

KE4腫瘍細胞のcDNAライブラリーから作製した合計 10^5 のクローンについて、VA13細胞にHLA-A2402と共にトランスフェクションし、CTLによるIFN-γの産生を増強する能力について試験した。この方法により、癌拒絶抗原をコードする遺伝子の同定が可能である (J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998)。

【0052】

具体的には、エフェクターとしての細胞傷害性T細胞として、HLA-A2402拘束・癌特異的細胞傷害性T細胞 (KE4-CTL) を用いた。この細胞は、食道癌患者から確立した (Int. J. Cancer, 81: 457-466, 1999)。また、腫瘍抗原取得のため、KE4腫瘍細胞を用い、そのポリ(A)⁺RNAを、cDNAに変換し、これをSalIアダプターと結合し、そして発現ベクターpSPORT-1 (GIBCO BRL) 中に挿入した。HLA-A2402または対照であるHLA-A0201のcDNAを、逆転写PCR (RT-PCR) によって得、そして、真核生物発現ベクターpCR3 (Invitrogen) 中にクローン化した。プラスミドDNAプールまたはKE4 cDNAライブラリーのクローンの200ngと、HLA-A2402またはHLA-A0201のcDNA200ngとを、OPTI-MEM (GIBC

O B R L) 70 μl 中で、リポフェクチン 1 μl と、15 分間混合した。

【0053】

混合物の 30 μl を、ついで、VA13 (2×10^4) 細胞に添加し、5 時間インキュベーションした。次に、10% の FCS を含む RPMI-1640 培地 200 μl を加え、2 日間培養した。その後、細胞傷害性 T 細胞 (10^4 細胞／ウェル) を添加した。18 時間インキュベーション後、上清の 100 μl を回収し、既に報告した (J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998) ように、ELISA キットを用いて IFN-γ を測定した。

【0054】

一つのクローン (クローン 21) が、HLA-A24 抜束性 KE4-CTL による認識を与えることを見いだした (図 1)。この cDNA クローンの塩基配列は 1,750 塩基 (bp) 長であり、かつ Lck タンパクのアミノ酸配列の大部分を含むポジション 31-506 に対応する lck 遺伝子の塩基配列であるポジション 283-2,032 と 100% 相同性を有することが判明した。

【0055】

【実施例 2】

(CTL により認識される抗原決定基の確認)

HLA-A24 分子結合性の、Lck タンパク由来の 13 個の異なったペプチドを C1R/A2402 に導入し、KE4-CTL による IFN-γ 産生を増強する能力について試験した。

【0056】

HLA-A2402 分子への結合能をもつ Lck 由来ペプチドは、HLA-A24 結合モチーフ (motif) に対するペプチドについて文献検索し、13 種の異なるペプチドを、lck 遺伝子産物の 509 アミノ酸配列 (Nature, 319: 682~685, 1986) に基づいて合成した。但し、一部アミノ酸に変更を加えたものもある。合成したペプチドを表 1 に示す。

【0057】

【表1】

Lckペプチド	アミノ酸配列											
39-48	:	R	N	G	S	E	Y	R	D	P	L	
71-80	:	S	Y	E	P	S	H	D	G	D	L	
114-122	:	N	F	V	A	K	A	N	S	L		
162-170	:	S	F	S	L	S	V	R	D	F		
191-199	:	F	Y	I	S	P	R	I	T	F		
208-216	:	H	Y	T	N	A	S	D	G	L		
303-312	:	L	Y	A	V	V	T	Q	E	P	I	
317-325	:	E	Y	M	E	N	G	S	L	V		
353-361	:	A	F	I	E	E	R	N	Y	I		
393-402	:	E	Y	T	A	R	E	G	A	K	F	
445-453	:	T	N	P	E	V	I	Q	N	L		
486-494	:	T	F	D	Y	L	R	S	V	L		
488-497	:	D	Y	L	R	S	V	L	E	D	F	

【0058】

抗原性ペプチドの検出のために、HLA-A2402でトランスフェクトしたVA13 (2×10^4) 細胞またはC1R/A2402細胞 (2×10^4) を、終濃度 $10 \mu M$ でペプチドと、2時間パルスした。ついで、細胞傷害性T細胞 (1×10^4) を加え、そして18時間インキュベーションした。上清の $100 \mu l$ を回収し、ELISAによって、IFN- γ を測定した。

【0059】

ペプチド特異性を検定するために、細胞傷害性T細胞の亜株 (subline) を、親株であるHLA-A2402拘束性KE4細胞傷害性T細胞株から、1

または10細胞／ウェルで、限定希釀培養 (limiting dilution culture) によって、確立した (J. Exp. Med. 187: 277~288, 1998)。抗CD3 (NuT3)、抗CD4 (NUTh/s)、抗CD8 (NuTC/i)、抗CD13 (MCS-2)、抗MHCクラスI (W6/32) または抗MHCクラスII (HDR1) 抗体をCTL活性の阻害実験のために用いた (Int. J. Cancer, 58: 317~323, 1994)。

【0060】

これらのペプチドのうち、6つのペプチド (Lck71-80、Lck208-216 (配列番号3)、Lck317-325、Lck353-361、Lck486-494 (配列番号1)、Lck488-497 (配列番号2)) が、CTLにおけるIFN- γ 産生増強活性を有しており (図2A)、特に3つのペプチド (Lck208-216 (配列番号3)、Lck486-494 (配列番号1)、Lck488-497 (配列番号2)) で強い活性が認められた。Lck486-494 (配列番号1)、またはLck488-497 (配列番号2) ペプチドの、CTLによるIFN- γ 産生を増強する活性は濃度依存的であり、1nM程度で認められた。一方、Lck208-216 (配列番号3) の活性は100nM以上で認められた (図2B)。

【0061】

HLA-A2402をトランスフェクトしたVA13細胞をこれらのペプチドでパルスし、刺激 (stimulator) 細胞として使用した場合も、同様の結果が得られた。3つの各ペプチドでパルスしたC1R/A2402細胞に対する反応におけるKE4-CTLによるIFN- γ 産生は抗CD3、抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害されたが、抗CD4、抗MHCクラスIIおよび抗CD13モノクローナル抗体では阻害されなかった (図2C)。従って、KE4-CTLは、CD3⁺CD8⁺CD4⁻表現型を有し、MHCクラスIを認識する細胞傷害性T細胞であることが確認された。

【0062】

CTLにおけるペプチドの特異性を確認するために、CD3⁺CD8⁺CD4

—表現型を有する20の異なったKE4-CTLの細胞亜株（subline）（1細胞／ウェルのウェルから11の細胞亜株、および10細胞／ウェルから11の細胞亜株）を3つの各ペプチドとの反応性について試験した。

【0063】

それらのうち、1細胞／ウェルからの一つの亜株（クローン #80）がLck486-494（配列番号1）を、10細胞／ウェルからの2つの亜株（亜株 #49および#93）がLck488-497（配列番号2）ペプチドを認識した（図2D）。10細胞／ウェルからの1つの亜株（亜株 #19）はLck208-216（配列番号3）およびLck486-494（配列番号1）の両方と反応した。他の16の亜株（1細胞／ウェルからの10亜株および10細胞／ウェルからの6亜株）はこれらのペプチドのいずれとも反応しなかった。

【0064】

【実施例3】

（Lckタンパクの発現）

種々の細胞および組織におけるタンパクレベルでのLck（56および59kD）の発現を、抗Lckモノクローナル抗体を用いてウェスタンプロット分析により検討した。

【0065】

原発性の結腸癌（n=49）、非腫瘍性の結腸（n=5）、肺癌（腺癌：n=8、扁平上皮癌[SCC]：n=8）、食道癌細胞を検討に使用した。さらに、大腸癌細胞株（COLO201, COLO205, COLO320, HCT116、およびSW620）、肺癌細胞株（LK87：腺癌細胞、およびLK79：小細胞癌細胞）、食道癌細胞株（KE4）も検討に用いた。

【0066】

試料は、10mMのTris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、0.5%Triton X-100、0.2mM PMSF（Sigma Chemical Co.）と0.03トリプシンインヒビター単位/m1のアプロチニンからなる緩衝液で溶解し、超音波処理し、そして14,000rpmで20分間遠心した。得られた上清を、細胞質基質（cytosol）画分として使用

した。溶解物は、10% SDS-PAGEで分離した。

【0067】

アクリルアミドゲル中で得られたタンパクは、HybondTM-ポリビニリデンジフルオライド膜(Amersham)に転写(blot)し、抗Lckモノクロナール抗体(Santa Cruz)と室温で4時間インキュベートした。他の方法は、既報告(Int. J. Cancer, 54:158-165, 1995)のウエスタンプロット分析に従った。

【0068】

Lckタンパクは未刺激の末梢血単核球(PBMC)では認められなかつたが、10μg/mlのフィトヘムアグロチニン(phytohemagglutinin; PHA)で48時間刺激した後の活性化されたPBMC(PHA-blast)の細胞質基質(cytosol)画分には検出されるようになった。LckタンパクはSCCまたは腺腫瘍細胞株を含む試験した全ての悪性腫瘍細胞株、並びに食道癌、肺SCCおよび肺腺癌細胞を含む、多種の臓器からの得られた新鮮腫瘍組織の大多数で検出された。一方、非腫瘍性の結腸組織のいずれでも全く検出されなかつた。これらの結果の概要を表2に示す。

【0069】

【表2】

Lckタンパクの発現		
	細胞株	組織
大腸		
腫瘍	5/5	38/49
正常		0/5
肺		
腺癌	1/1	8/8
扁平上皮癌		6/8
小細胞癌		
食道	1/1	8/8

【0070】

【実施例4】

(ペプチドによる細胞傷害性T細胞の誘導：例1)

3つのペプチド (Lck208-216 (配列番号3)、Lck486-494 (配列番号1)、Lck488-497 (配列番号2)) について、大腸癌患者から得たPBMCから、Lckタンパクを発現した腫瘍細胞株 (KE4、SW620およびCOLO201) に対するHLA-A24拘束性CTLを誘導する活性を試験した。

【0071】

HLA-A24⁺患者または健康ドナーのPBMC (2×10^6) を、培養培地 (45% RPMI-1640培地, 45% AIM-V^R (登録商標) 培地/GIBCO BRL, およびIL-2の100U/mlと0.1mMのMEMノンエッセンシャルアミノ酸溶液/GIBCO BRLを含む10%FCS) 2mlを含む24ウェルプレートの各ウェル中で、ペプチド10μMとインキュベートした。

【0072】

培養7日と14日で、細胞は回収し、洗浄し、そして、放射線照射 (50グレイ) した自己由来PBMCまたは樹状細胞からなるペプチドパルス抗原提示細胞 (APC) で刺激した。この樹状細胞は、10%FCSと100U/mlのIL-4と100U/mlのGM-CSF (顆粒球・マクロファージーコロニー刺激因子) を含むRPMI1640 (GIBCO BRL) 中で、PBMC (2×10^6 細胞/ウェル) を7日間インキュベーションすることにより誘導した。

【0073】

エフェクター細胞は、培養21日に採取し、直ちにELISA法を使い種々の標的細胞に対する反応性におけるIFN-γの産生能をテストした。⁵¹Cr遊離試験のために、ペプチドを用いて3回刺激したPBMCは、相当するペプチドで予めパルス処理した放射線処理HLA-A24⁺異種PBMC (2×10^5 細胞/ウェル) からなるフィーダー細胞と共にさらに培養した。

【0074】

これら細胞の細胞傷害性T細胞活性は、再培養の約24日目にIFN-γ活性

を再確認することで行い、そしてこれら細胞について、6時間⁵¹Cr遊離試験を異なるエフェクター／ターゲット比で行い、それらの細胞傷害性を検討した。

【0075】

Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）を用いてin vitroで3回刺激したPBMC、特にLck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）で刺激したPBMCは、HLA-A24⁻腫瘍細胞（COLO201）に対する反応より、HLA-A24⁺腫瘍細胞（KE4およびSW620）に対する反応において、より多くのIFN-γを産生した（図3）。

【0076】

一方、健常人から得たPBMCは、抗原提示細胞（APC）として放射線照射したPBMCを用いてパルスした3つのペプチドのいずれを用いて刺激しても、HLA-A24拘束性のCTL活性は示さなかった。健常人から得られたPBMCはペプチドをパルスした樹状細胞（Dendritic Cell；DC）をAPCとして用いて刺激した時にHLA-A24拘束性のCTL活性を示した。結果を表3に示す。

【0077】

【表3】

ドナー	抗原提示細胞	ペプチド	癌細胞株の認識によるインターフェロン-γ産生量 (pg/ml)		
			KE4 (A24 ⁺)	SW620 (A24 ⁺)	COL0201 (A24 ⁻)
大腸癌患者	自己末梢血単核球	なし	1079	902	194
		Lck208-216	1479	1113	188
		Lck486-494	1857	1724	289
		Lck488-497	2527	2140	424
健常ドナー1	自己樹状細胞	なし	230	380	54
		Lck208-216	570	786	124
		Lck486-494	1105	2061	177
		Lck488-497	621	966	122
健常ドナー2	自己末梢血単核球	なし	101	187	0
		Lck208-216	82	128	1
		Lck486-494	41	94	10
		Lck488-497	90	140	6

【0078】

ペプチドが誘導したCTL活性は、6時間の⁵¹Cr遊離試験により確認した。これらのLck由来のペプチドで刺激したPBM Cは、HLA-A24⁺KE腫瘍細胞およびSW620腫瘍細胞を溶解したが、健常人からのHLA-A24⁺PHA活性化T細胞またはHLA-A24⁻COL0201腫瘍細胞はいずれも溶解しなかった(図4)。

【0079】

【実施例5】

(ペプチドによる細胞傷害性T細胞の誘導：例2)

3つのペプチド(Lck208-216(配列番号3)、Lck486-494(配列番号1)、Lck488-497(配列番号2))について、癌患者から得たPBM Cから、Lckタンパクを発現した腫瘍細胞株(KE4、SW620およびCOL0201)に対するHLA-A24拘束性CTLを誘導する活性を、IFN-γ産生量を指標に測定した。CTLの誘導方法、およびIFN-γ測定方法は実施例4と同様の方法を用いた。

【0080】

その結果、表4に示すように、大腸癌患者および食道癌患者のPBM Cから、Lck208-216（配列番号3）、Lck488-497（配列番号2）によりCTLが誘導された。

【0081】

【表4】

症例	年齢	性別	癌種	転移の有無	LckペプチドによるCTL誘導			
					ペプチド(-)	Lck208-216	Lck486-494	Lck488-497
N.I.	51	男性	大腸癌	+	-	+	-	+
Y.K.	73	女性	食道癌	+	試験せず	+	-	+

【0082】

次に、該大腸癌患者のPBM C (2×10^6 個) を予め、3つのペプチド、Lck208-216（配列番号3）、Lck486-494（配列番号1）、Lck488-497（配列番号2）を加えて刺激し、その後、抗原提示細胞として各ペプチドを $10 \mu g / ml$ 加えてインキュベートしたHLA-A24⁺のC1R/A2402細胞に加えてさらに培養し、培養上清中に產生されたIFN- γ 量を測定した。図5に示すように、予め、Lck486-494（配列番号1）またはLck488-497（配列番号2）で刺激した大腸癌患者のPBM Cは、抗原提示細胞に提示されたペプチド、それぞれLck486-494（配列番号1）またはLck488-497（配列番号2）にのみ反応してIFN- γ 产生、すなわちCTLを誘導した。つまり、Lck486-494（配列番号1）またはLck488-497（配列番号2）は大腸癌患者のPBM Cから、予備刺激することによりペプチド特異的なCTLを誘導しうることが判明した。一方、Lck208-216（配列番号3）またはペプチド非存在下で大腸癌患者のPBM Cを予め刺激した場合は、ペプチド特異的なCTLは誘導できなかった。

【0083】

次に、該大腸癌患者から誘導されたCTLの性状を検討するために、標的細胞としてSW620細胞を用い、抗CD4（NUTh/s）、抗CD8（NuTC

/i)、抗CD14、抗MHCクラスI (W6/32) または抗MHCクラスI I (HDR1) 抗体をそれぞれ10μg/ml、Lck488-497 (配列番号2) を10μg/ml加え、さらに上記大腸癌患者から誘導されたCTLを加えて、インキュベーションし、上清中に產生されるIFN-γ量を測定した(図6)。その結果、CTLからのIFN-γ产生は抗CD8および抗MHCクラスIモノクローナル抗体によって阻害された。すなわち、大腸癌患者から誘導されたCTLは、CD8⁺CD4⁻表現型を有しMHCクラスIを認識する細胞傷害性T細胞であることが確認された。

【0084】

上記大腸癌患者のPBM中のCTL前駆細胞について検討を行った。96ウェルプレートにSW620細胞を播いてインキュベートし、予めLck488-497 (配列番号2) で刺激した上記大腸癌患者のCTLを1個~100個/ウェルとなるよう加えてさらに培養し、標的細胞であるSW620細胞の生存するウェルを確認した。対照として、ペプチドで刺激しない上記大腸癌患者のCTLを用いた。結果は図7に示す。ペプチドで刺激しない大腸癌患者のPBM中のCTL前駆細胞の頻度は1/634であり、Lck488-497 (配列番号2) で刺激した場合、1/81であり、ペプチド刺激すると明らかに、CTL前駆細胞が増加することが認められた。

【0085】

【実施例6】

(CTL誘導性を有するペプチドの検討)

以上のように、Lck由来の3つのペプチドLck208-216 (配列番号3) (HYTNASDGL) Lck486-494 (配列番号1) (TFDYLRSVL) およびLck488-497 (配列番号2) (DYLRSVLED) がHLA-A24⁺腫瘍細胞株を認識するCTLを誘導することができることを見出した。これらの結果から、2つのペプチドLck486-494 (配列番号1) およびLck488-497 (配列番号2) の重なる領域である、一定のアミノ酸DYLRSVを、抗原のエピトープとして認識し、Lckペプチドのこの部位を含むキナーゼドメインを認識する、ペプチドで誘導されたCTLは、腫

癌拒絶に対する意義を有することが示唆される。このアミノ酸配列 D Y L R S V に着目し、この配列に相同性をもつペプチドを検索したところ、表5に示す様に、Lckと同じSrcファミリーに属するチロシンキナーゼ (Ann. Rev. Biochem. 54: 897-930, 1985) に、相同性を有するアミノ酸配列をもつものがあることが判明した(表5)。

【0086】

【表5】

		488-497
<u>Lck</u>	<u>486-498</u>	: T F D Y L R S V L E D F F
		486-494
<u>Src</u>	<u>511-523</u>	: T F E Y L Q A F L E D Y F
<u>Yes</u>	<u>508-520</u>	: T F E Y I Q S F L E D Y F
<u>Fgr</u>	<u>504-516</u>	: T F E Y L Q S F L E D F F
<u>Fyn</u>	<u>512-524</u>	: T F E Y L Q S F L E D Y F
<u>Lyn</u>	<u>489-501</u>	: T F D Y L Q S V L D D F Y
<u>Hck</u>	<u>503-515</u>	: T F E Y I Q S V L D D F Y
<u>Bik</u>	<u>482-494</u>	: T F E F L Q S V L E D F Y

【0087】

これらSrcファミリー由来のペプチドのアミノ酸配列に基づいて、PSrc (配列番号4: TFEYLQAF), PYes (配列番号5: TFEYIQSFL), PFyn (配列番号6: TFEYLQSFL), PLyn (配列番号7: TFDYLQSVL), PHck (配列番号8: TFEYIQSVL), PB1k (配列番号9: TFEFLQSVL) を合成し、各10 μg/mlを、標的細胞としてのSW620細胞とともにインキュベートし、さらに実施例1および実施例2で用いたKE4-CTL細胞を加えて培養し、培養上清中に產生されたI

FN- γ 量を指標としてCTL誘導活性を調べた。また、陽性コントロールとして標的細胞にKE4を使用した。その他の方法は実施例4を同様の方法を用いた。図8に示すように、各Srcファミリー由来のペプチドは、Lck由来のペプチドと同様、あるいはそれ以上のCTL誘導能を示した。

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の3つのLckペプチドおよびSrcファミリー由来のペプチドは、大腸癌患者からのPBMCでHLA-A24拘束性のCTL活性を誘導することができ、Lckタンパクは大腸、肺および食道を含む大多数の癌組織で検出できることが判明した。HLA-A24対立遺伝子(a11e1e)は日本人の人口の約60%（多くは、その95%の遺伝型がA2402である）、コーカサス人の20%、アフリカ人の12%で見られる。従って、これらのペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。かくして本発明で提供されるペプチド、これをコードするヌクレオチド、抗体は、癌の治療および診断の分野で、極めて有用な手段を提供する。

【配列表フリーテキスト】

配列番号10：Srcファミリーチロシンキナーゼのアミノ酸配列に基づいて作製した、HLA-24拘束性のCTLを誘導する能力を有するペプチド。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Tumor Antigen

<130> DP99-1055

<160> 10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 1

Thr Phe Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Asp Tyr Leu Arg Ser Val Leu Glu Asp Phe

1

5

10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 3

His Tyr Thr Asn Ala Ser Asp Gly Leu

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 4

Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 5

Thr Phe Glu Tyr Ile Gln Ser Phe Leu

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 6

Thr Phe Glu Tyr Leu Gln Ser Phe Leu

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 7

Thr Phe Asp Tyr Leu Gln Ser Val Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 8

Thr Phe Glu Tyr Ile Gln Ser Val Leu

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> human

<400> 9

Thr Phe Glu Phe Leu Gln Ser Val Leu

1

5

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed peptide based on amino acid sequence of Src family tyrosine kinases, which peptide has an ability to generate HLA-A24 restricted cytotoxic T lymphocytes

<220>

<222> position 3

<223> Xaa can be Asp or Glu.

<220>

<222> position 4

<223> Xbb can be Tyr or Phe.

<220>

<222> position 5

<223> Xcc can be Leu or Ile.

<220>

<222> position 6

<223> Xdd can be Arg or Gln.

<220>

<222> position 7

<223> Xee can be Ser or Ala.

<220>

<222> position 8

<223> Xff can be Val or Phe.

<220>

<222> position 10

<223> Xgg can be Glu or Asp.

<220>

<222> position 12

<223> Xhh can be Phe or Tyr.

<220>

<222> position 13

<223> Xii can be Phe or Tyr.

<400> 10

Thr Phe Xaa Xbb Xcc Xdd Xee Xff Leu Xgg Asp Xhh Xii

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 KE4-細胞傷害性T細胞（KE4-CTL）によるLck遺伝子産物の認識を示す図である。

【図2】ペプチド抗原の分析結果を示す図であり、

- A) は、C1R/A2402細胞にHLA-A2402と共にトランスフェクトしたときの、各種LckオリゴペプチドのIFN- γ 産生量を示し、
- B) は、各Lckオリゴペプチドの量によるIFN- γ 産生量の変化を示し、
- C) は、親株の細胞傷害性T細胞（CTL）によるペプチド認識を種々の抗体存在下で行い、CTLの細胞表現型（phenotype）およびMHC拘束性を確認した結果を示し、
- D) は、KE4-CTL亜株（subline）のペプチド認識における差違を示す。

【図3】各種腫瘍細胞株（KE4（HLA-A24 $^+$ ）、SW620（HLA-A24 $^+$ ）、COLO201（HLA-A24 $^-$ ））によるKE4-CTLの活性化を、IFN- γ 産生を指標に調べた結果を示す図である。

【図4】Lck由来ペプチドにより誘導されるCTLの各種腫瘍細胞に対する細胞傷害性活性を、 ^{51}Cr の遊離試験により検討した結果を示す図である。

【図5】大腸癌患者の末梢血単核球（PBMC）からペプチドにより誘導されたCTLの、ペプチドに対する特異性を示す図である。

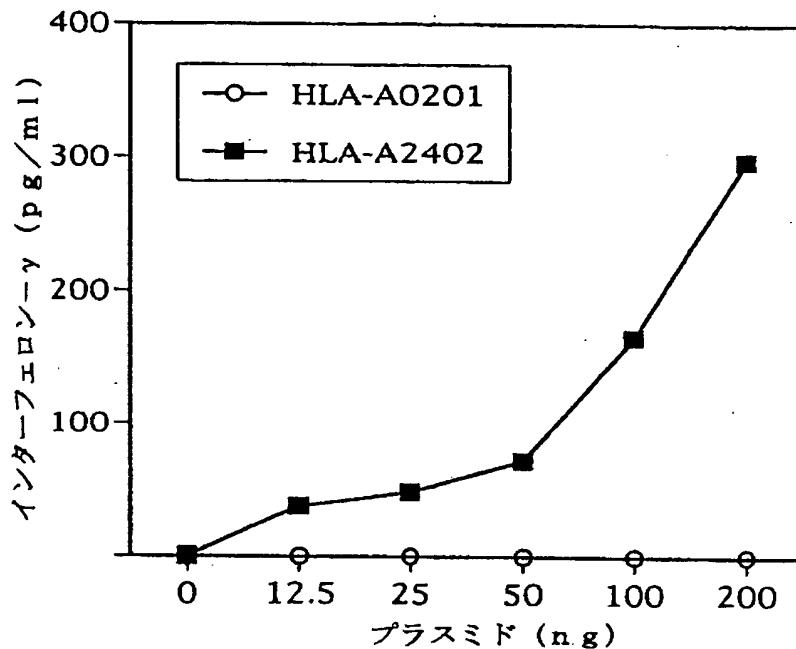
【図6】大腸癌患者の末梢血単核球（PBMC）からのペプチドによるCTL誘導を種々の抗体存在下で行い、誘導されたCTLの細胞表現型（phenotype）およびMHC拘束性を確認した結果図である。

【図7】大腸癌患者の末梢血単核球（PBMC）中の、ペプチドにより誘導されるCTL前駆細胞の頻度を示す図である。図中、横軸は1ウェルあたりの加えたCTL数を表し、縦軸は増殖陰性分画（fraction negative culture）を表す。縦軸において、1はCTLが誘導されず、CTLにより溶解（lysis）されるべき標的細胞が100%生存していることを示し、0.2は標的細胞が100%死滅している（CTL前駆細胞頻度 = 1 / 96）ことを示す。

【図8】S r c ファミリー由来のペプチドによる、KE4-細胞傷害性T細胞（KE4-CTL）の活性化を示す図である。

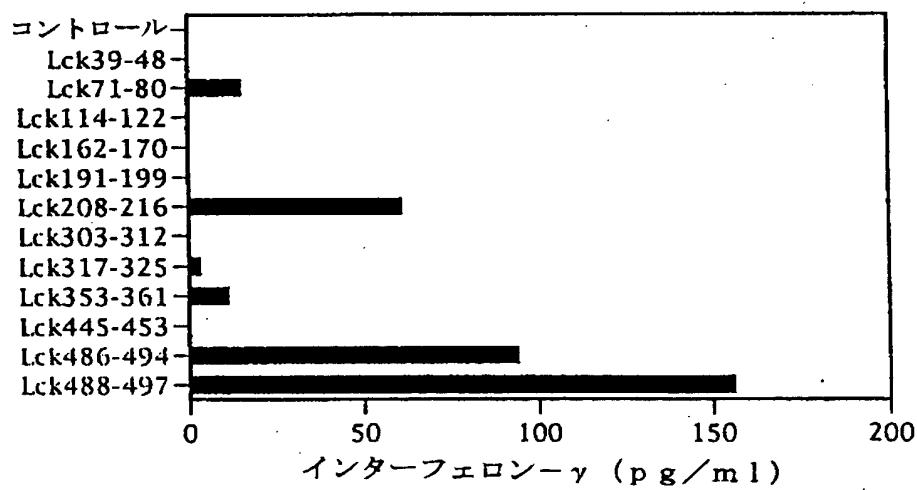
【書類名】 図面

【図1】

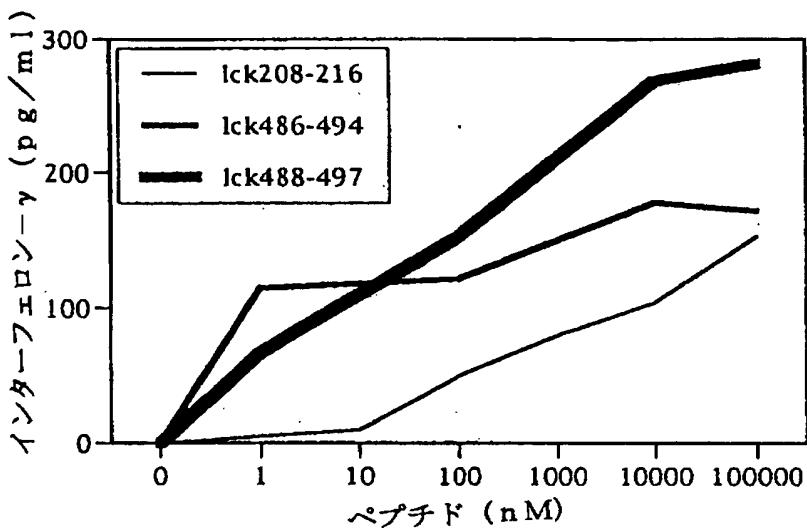


【図2】

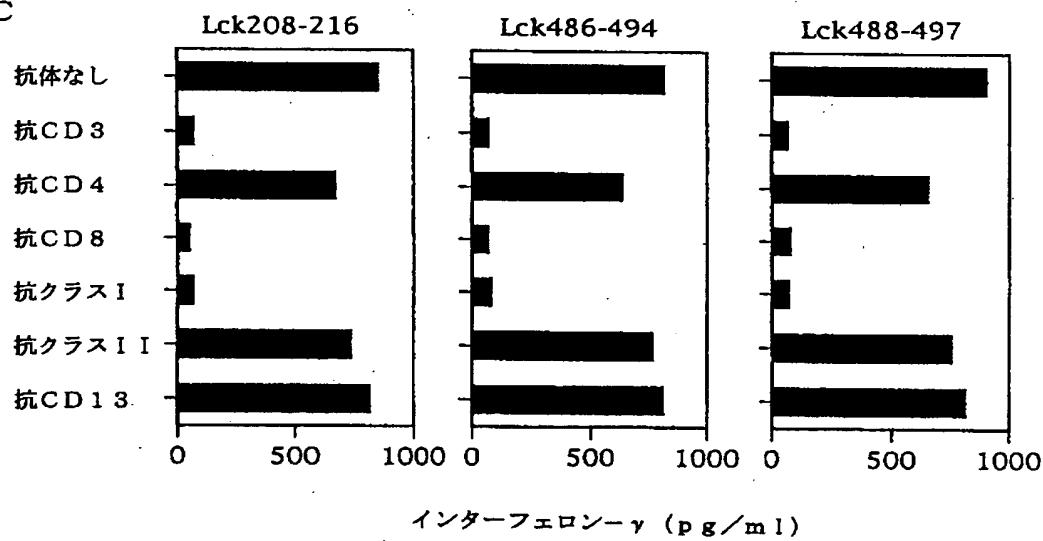
A



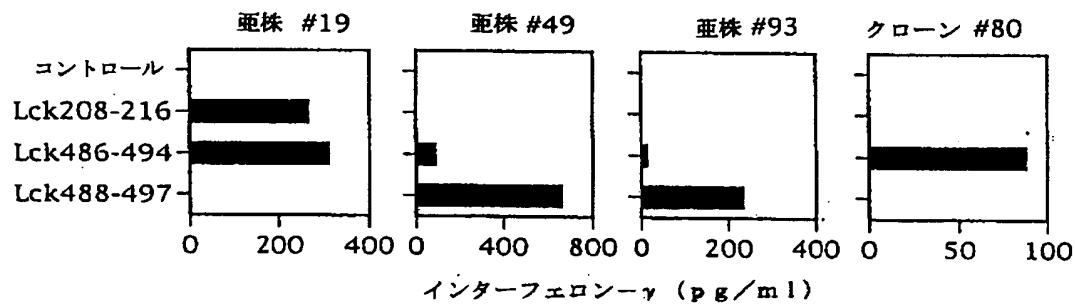
B



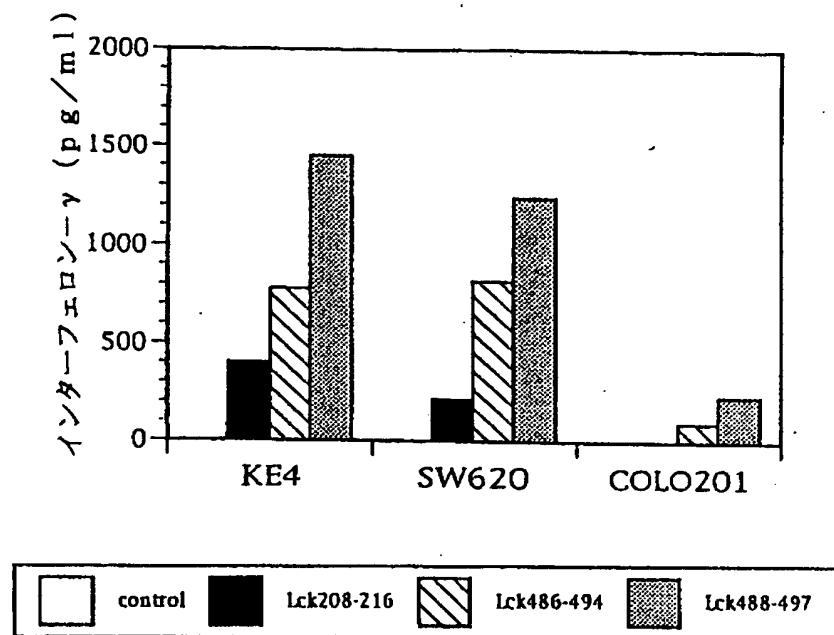
C



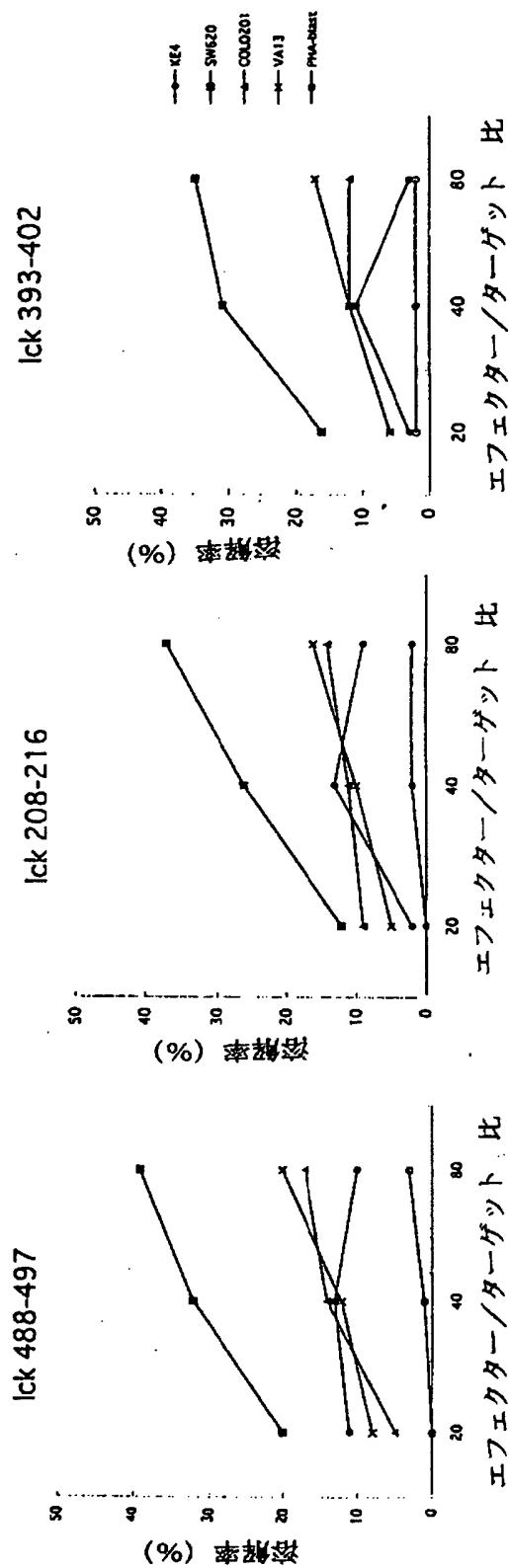
D



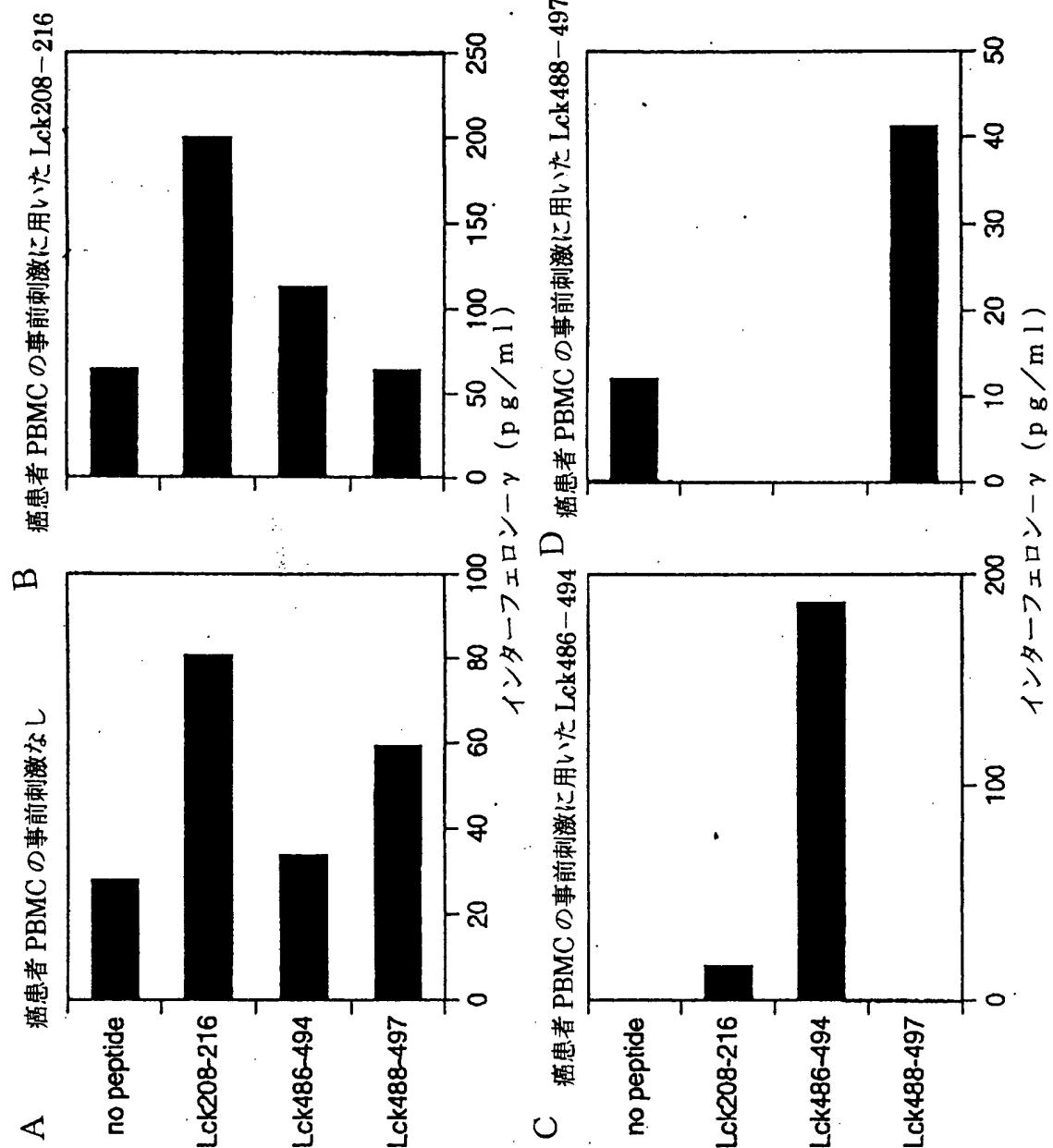
【図3】



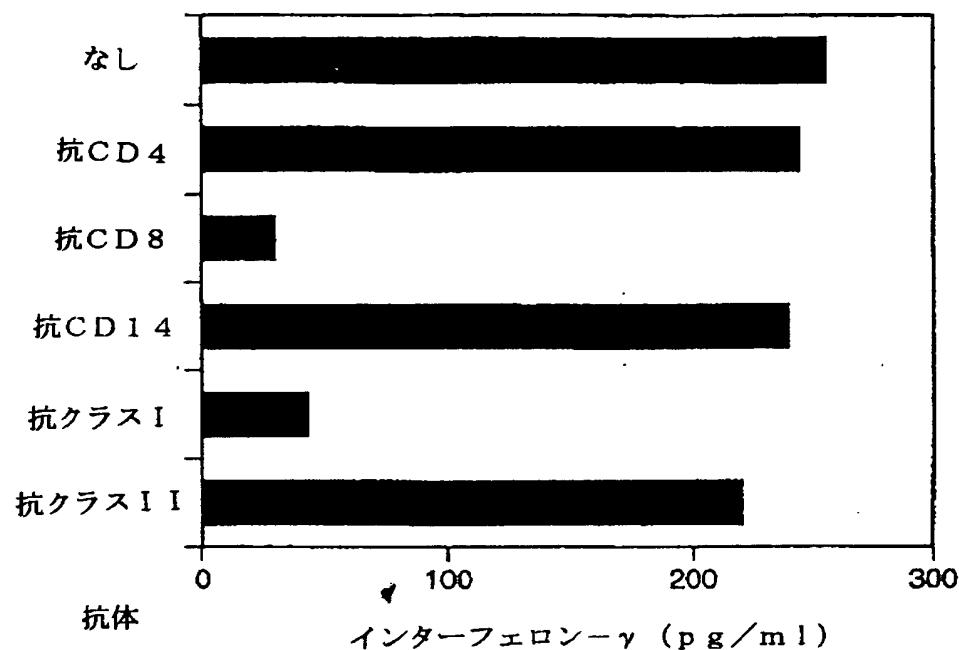
【図4】



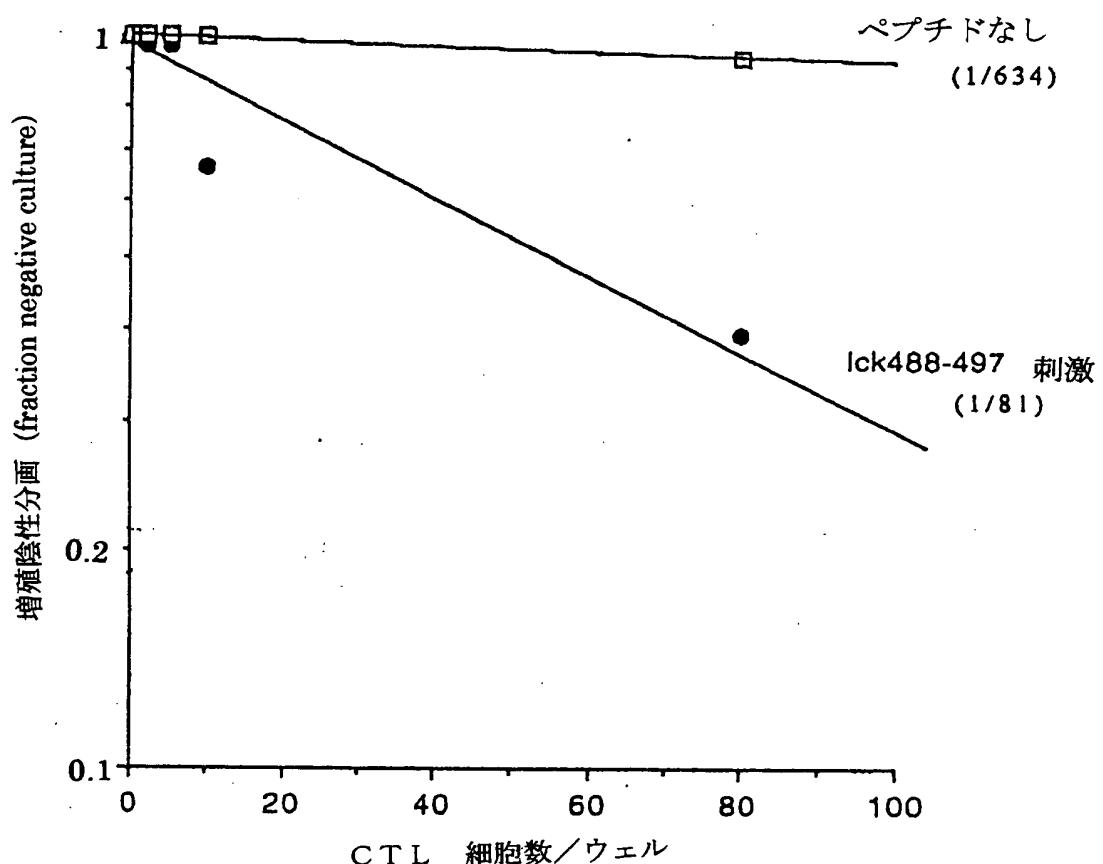
【図 5】



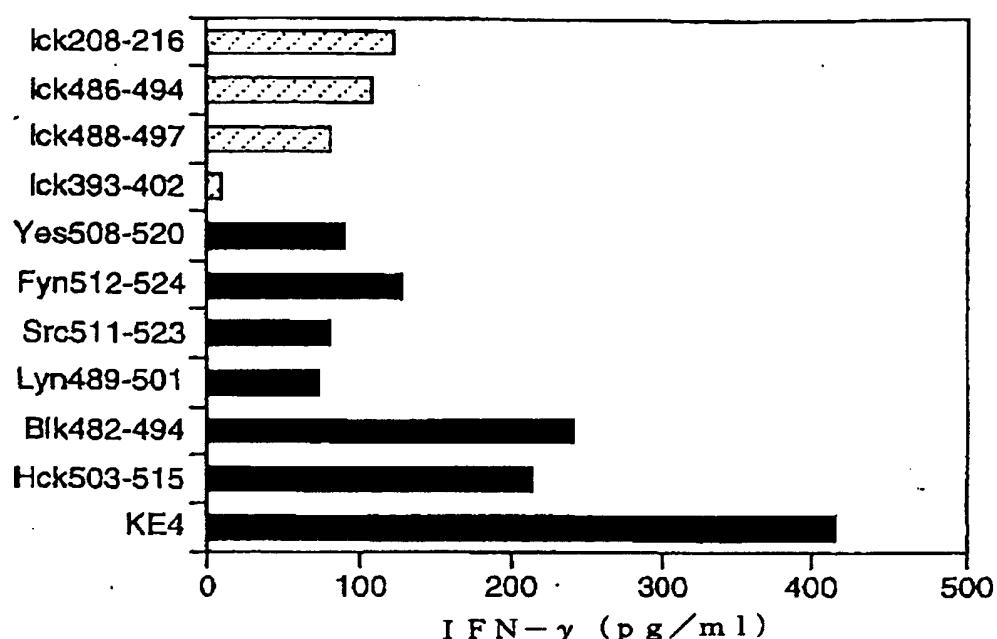
【図6】



【図7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【課題】 腺癌、および上皮性の癌、例えば大腸癌や肺癌の患者の特異的免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞による認識性を有する新規な腫瘍抗原を見出し、提供すること。

【手段】 HLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞により認識される、1c k遺伝子がコードする抗原エピトープを有するポリペプチド、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、このポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、組み換えベクターを含む形質転換体、ポリペプチドの製造方法、ポリペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物およびそのスクリーニング方法、これらを利用する医薬組成物、およびこれらを利用する診断手段。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 平成11年 特許願 第222101号
受付番号 59900756597
書類名 特許願
担当官 第五担当上席 0094
作成日 平成11年 8月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成11年 8月 5日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [596094371]

1. 変更年月日 1996年 6月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9

氏 名 伊東 恭悟